

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15425

研究課題名（和文）PP6ホスファターゼの活性低下は、がん発生のスイッチとなるマウス発がん実験

研究課題名（英文）Decreased activity of PP6 phosphatase is a switch in oncogenesis-mouse carcinogenesis experiment

研究代表者

金澤 孝祐（Kanazawa, Kousuke）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん薬物療法研究部・共同研究員

研究者番号：60898279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：膵細胞特異的に、二重変異（KRAS(G12D)変異とTrp53欠損）を導入したマウスにおいて、PP6遺伝子（Ppp6c）を欠損させると150日以内に全てのマウスにおいて、膵臓腫瘍を発症し衰弱して死亡した。変異誘発後80日目における腫瘍発生に関して検討した。Ppp6c欠損マウスの膵臓では、コントロールと比較して、腫瘍の数と大きさ、前癌病変の数が有意に増加した。Ppp6c欠損マウスの膵臓で認められた腫瘍は、病理学的にはEMTを起こしたPDACと診断された。また、サルコペニア、脂肪組織の消失、血清中IL-6の上昇、解糖系代謝が亢進し、ヒトの膵臓で認められる悪液質に類似した症状を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは、初期にKRAS変異が起こり、次にp53の遺伝子異常が起こり、引き続いていくつかの遺伝子異常が重なることによって発症すると考えられている。一方で、KRAS変異やp53異常は、それを標的とする治療薬がないのが治療上の課題となっている。

本研究により（1）膵臓がんの新規抑制遺伝子としてPP6を同定した。（2）悪液質を呈するヒトの膵臓がんの発生モデルとなるマウスを作製した。（3）本マウスを用いて、新規の治療法のスクリーニングをすることが可能となった。（4）NfκBの阻害剤、ERKの阻害剤、およびPP6の活性化剤が、新しい治療法になる可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：Here, we report that Ppp6c loss in pancreas of cKP (K-rasG12D + Trp53-deficient) mice promotes death from cancer within 150 days of induction of the mutation. Ppp6c-deficient mice showed accelerated cancer development and progression, and wasting with cachexia. We conclude that Ppp6c is a novel pancreatic tumor suppressor gene. To the best of our knowledge, ours is the first demonstration that a serine/threonine phosphatase functions as a tumor suppressor gene in mouse pancreatic carcinogenesis. Phenotypes seen in cKP(F/F) mice at the 80 day time point included weight loss, low serum albumin, muscle atrophy, loss of adipose tissue, and increased levels of inflammatory cytokines in serum, which is indicative of cachexia. High serum IL-6 levels also likely account for reduction in muscle and adipose tissue in these mice, as has been reported. cKP(F/F) mice exhibited symptoms of cachexia similar to those seen in human pancreatic cancer.

研究分野：実験病理学関連

キーワード：舌癌 マウス発がん実験 PP6 KRAS

1. 研究開発当初の背景

PP6 はマウス皮膚でがん抑制遺伝子として働く。では、膵臓ではどうか？

我々は、DMBA マウス皮膚化学発がん実験で、PP6 の触媒サブユニット (Ppp6c) の欠損が腫瘍化を強力にドライブすることを見出した。上記のメカニズムの解明の過程で明らかとなったことは、PP6 が、変異型 KRAS による腫瘍化を抑える機能があるということであった。Ppp6c 欠損によって、KRAS の下流である AKT 経路が異常に活性化していた。

しかし、これらはいずれも皮膚がんでの発見であった。ここで興味を持ったのは、膵臓がんである。膵臓がんは 90% 以上が KRAS 変異をもつ難治がんである。もし、PP6 が膵臓がんにおいても、変異型 KRAS 依存性の腫瘍形成を抑えることができれば、PP6 を利用した治療法開発の可能性があると考えた。この期待を持って、本研究を企画した。

2. 研究の目的

脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) からの治療開発の可能性

がん治療に使われている分子標的薬の多くはキナーゼ阻害剤である。そこで切実な問題になっているのは、標的キナーゼ変異による耐性獲得である。それを防ぐ方法として、ホスファターゼを活性化させることで、耐性を起こらなくさせるというアプローチが提唱されている。研究の進んでいる PP2A ホスファターゼでは、その小分子活性化剤が合成され、キナーゼ阻害剤との併用が試みられている。PP6 についても同様の可能性を追求したい。

異常 KRAS を標的とする治療開発への挑戦

KRAS 変異は、undruggable な標的と見なされてきた。しかし、KRAS 陽性膵臓がん・肺がんは何としても克服しなければならない。米国では NCI を中心に RAS イニシアティブが立ちあがった。本研究もその潮流の中にある。この研究は完全にオリジナルな発見から企画されたものであり、全く新しい視点からの提案ができると考える

3. 研究の方法

実験に用いるマウスの作製

我々の開発した Ppp6c^{F/F} マウスと、Pdx1-Cre^{ERT2} マウス、Kras^{LSL-G12D/+} マウス、および p53^{F/F} マウス (いずれも Jackson 研) を掛け合わせて以下のマウスを作製する。遺伝子発現・欠損の誘導剤としてタモキシフェン (TAM) を用いて、膵細胞に以下の遺伝子変異を導入して膵発がんの有無を検討する。

cK6c マウス (膵特異的に、変異型 KRAS + Ppp6c 欠損)

変異型 KRAS + Ppp6c ホモ欠損 : Pdx1-Cre^{ERT2}; KRAS^{LSL-G12D/+}; Ppp6c^{F/F}

変異型 KRAS + Ppp6c ヘテロ欠損 : Pdx1-Cre^{ERT2}; KRAS^{LSL-G12D/+}; Ppp6c^{F/+}

変異型 KRAS + Ppp6c 正常 : Pdx1-Cre^{ERT2}; KRAS^{LSL-G12D/+}; Ppp6c^{+/+}

cKP6c マウス (膵特異的に、変異型 KRAS + p53 欠損 + Ppp6c 欠損)

変異型 KRAS + p53 欠損 + Ppp6c ホモ欠損 : + p53^{F/F}

変異型 KRAS + p53 欠損 + Ppp6c ヘテロ欠損 : + p53^{F/F}

変異型 KRAS + p53 欠損 + Ppp6c 正常 : + p53^{F/F}

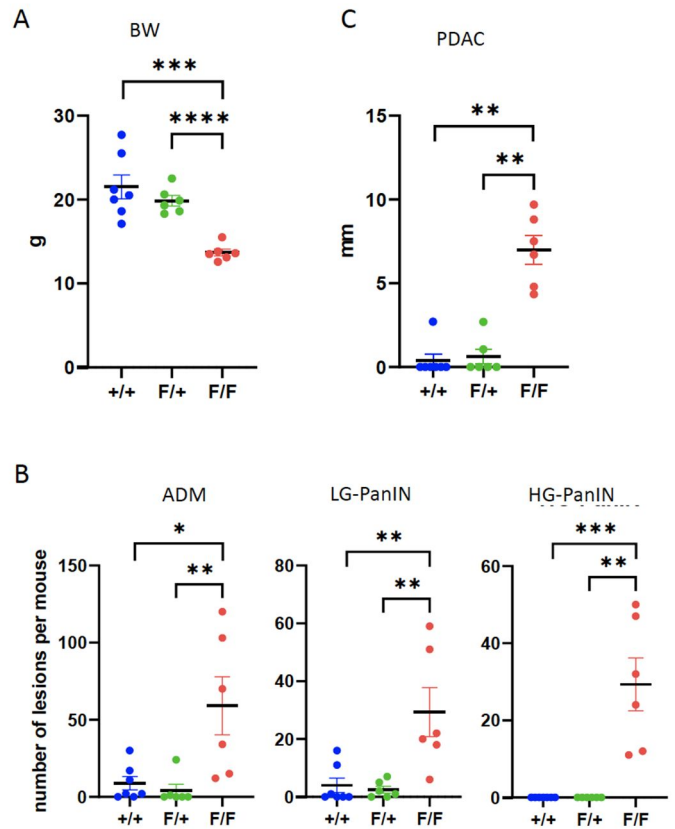
4. 研究成果

K6c マウスを用いた実験では、明瞭な結果が得られなかった。明快な結果がでた、KP6c マウスの実験結果について記す。

課題 1 と課題 2 に関しては、Ppp6c 欠損に関してクリアの結果が出なかった。明快な結果がでた、課題 3 についてしるす。

(1) cKP マウスにおける Ppp6c の欠損は、膵管腺癌の発生と悪性を促進する

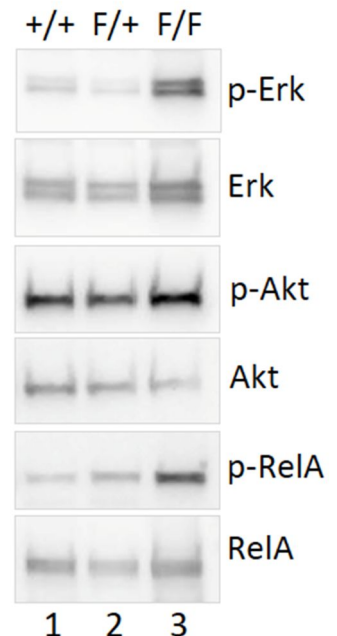
*Ppp6c*の欠損が腫瘍形成にどのような影響を与えるかを調べるために、cKP (+/+) (n = 7), cKP (F/+) (n = 6), cKP (F/F) (n = 6) マウスに対して、出生直後にタモキシフェン投与により変異を導入させ、80日齢のマウスの膵臓の病理学的特徴を分析した。右図に示すように、KP (F/F) マウスは、cKP (+/+) マウスや cKP (F/+) マウスに比べて、80日時点で著しい体重減少 (~20%) が認められた(A)。次に、H&E染色した切片でADMと低悪性度および高悪性度の上皮内新生物 (LG-PanIN および HG-PanIN) の病巣を病理学的に解析したところ、cKP (F/F) では、cKP (+/+) や cKP (F/+) と比べてADM, LG-PanIN, HG-PanIN の数が有意に増加し (B)、6匹のcKP (F/F) マウスすべてに膵臓腫瘍が発生した (C)。一方、cKP (+/+) では7匹中1匹、cKP (F/+) では6匹中2匹に腫瘍が認められた (C)。cKP (+/+) と cKP (F/+) のマウスに認められた腫瘍は独立した3人の病理医によって病理学的に高分化型PDACと診断された。一方で、cKP (F/F) の腫瘍は、中~低分化型のPDACと診断された。腫瘍の直径は、cKP (+/+) と cKP (F/+) の遺伝子型に比べてcKP (F/F) の方が大きかった (C)。cKP (F/F) に見られた6つの腫瘍のうち、2つは十二指腸に浸潤し、1つはリンパ節に浸潤していた。cKP (F/F) の膵臓の代表的な腫瘍は、中~低分化型の膵管腺癌 (PDAC) に分類され、Cytokeratin陽性の腫瘍細胞がVimentin陽性の異型間質細胞に囲まれていた。これらの所見から、上皮間葉転換 (EMT) の発生が示唆された。さらにEMT発生を確認するために、抗Snail抗体を用いての組織染色を行い、一部の細胞の核が染色されるのが確認された。これらの細胞ではEMTが発生していることが確認された。



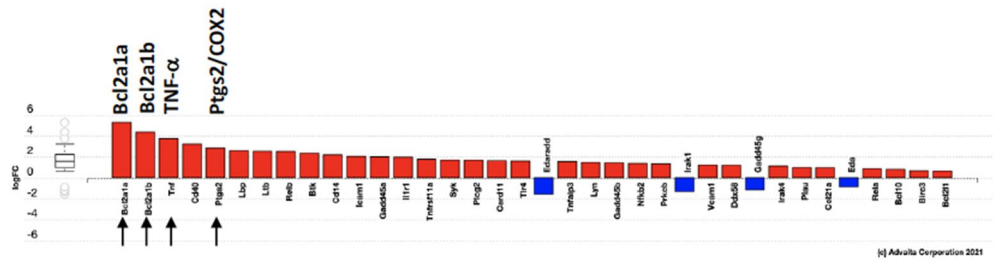
(2) cKP マウスの膵臓において、*Ppp6c* の欠損は Erk および NF B シグナルを活性化する

cKP (F/F) における早期の発癌発生の要因を調べるために、出生直後にタモキシフェン投与後、30日齢の膵臓組織において、cK (F/F) において特異的に活性化したシグナル伝達経路の同定を行なった。RAS 下流への影響を解析するためには、RAS の主要なエフェクターである Erk と Akt のリン酸化を調べ、また、PP6 の標的への影響を解析するために、NF B シグナルの主要な転写因子である RelA サブユニットのリン酸化を調べた。ウェスタンブロット解析によると、cKP (+/+) や cKP (F/+) と比較して、cKP (F/F) マウスの膵臓では Erk と RelA のリン酸化が顕著に上昇していたが、Akt のリン酸化には有意な差は認めなかった (右図)。

次に、cKP (F/F) マウスと cKP (F/+) マウスのそれぞれ3匹ずつの膵臓組織から得られた mRNA を用いて、*Ppp6c* 欠損が遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。NF B シグナルに関しては、次ページ図に示すように、関連する36の遺伝子の発現が、30日目において、統計的に有意 (q < 0.05) に増加または減少していた。重要なのは、RelA の直接の標的である *Bcl2a1a* および *Bcl2a1b* (生存因子)、*TNF* (サイトカインおよびポジティブフィードバック因子)、*COX2* (炎症調節因子) のすべてが、cKP (F/F) 膵臓で顕著に上昇していたことである。さらに注目すべきは、TNF 経路で転写制御されている *IL-6*、*IL-1β*、*Ccl2* などのサイトカインをコードする遺伝子も、cKP (F/F) 膵臓で顕著に発現が増加していたことである。

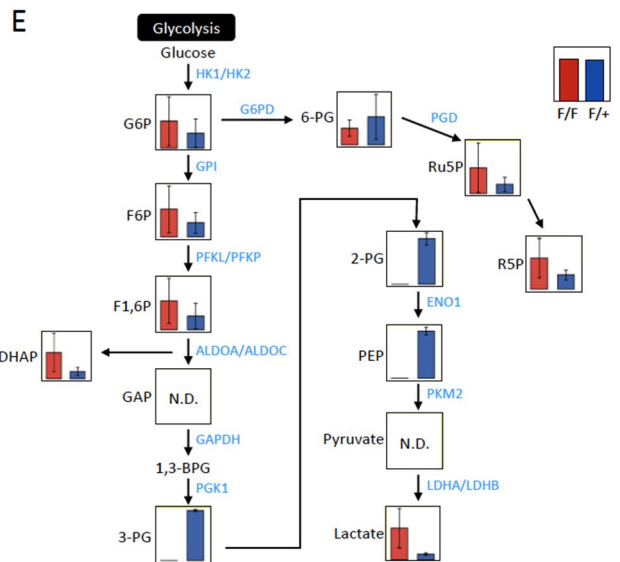


以上より、cKP マウスの膵臓では、*Ppp6c* が欠損すると 30 日以内に Erk と RelA が活性化され、細胞の生存、増殖、炎症に関わる遺伝子の発現が増加した。さらに、組織染色によって、Erk と RelA の活性化は前がん病変部で生じており、発がんに密接に関与していることが示唆された。



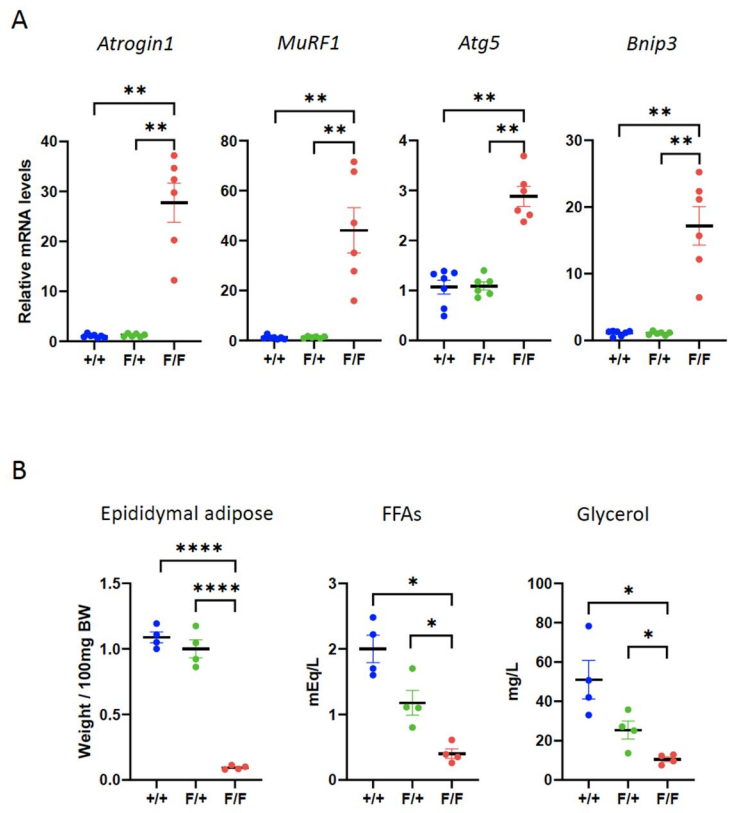
(3) 80 日齢 cKP (F/F) の膵臓腫瘍では、サイトカイン産生の上昇、EMT の誘導、および乳酸産生を伴う解糖系の亢進を認めた

次に、80 日齢の cKP (F/F) と cKP(F/+) の膵臓組織における transcriptome を比較したところ、遺伝子発現パターンが大きく異なることがわかった。cKP (F/F) では、30 日目に見られた Erk シグナル経路に関係する遺伝子発現上昇が 80 日目まで持続していた。また、30 日目に見られた NF- κ B および TNF シグナル経路に関連する遺伝子の発現上昇が、80 日目まで持続していた。そこで、転写レベルで上昇していた 4 種類の炎症性サイトカイン (TNF、IL-6、IL-1、Ccl2) が、血清のレベルでも上昇しているのかを調べた。それらの 4 種類の炎症性サイトカイン、特に IL-6 のレベルが、cKP (F/F) の血清では cKP (+/+) および cKP (F/+) と比較して著しく上昇していることがわかった。一方、80 日齢の cKP (F/F) では血清アルブミンが低く、低栄養状態であることが示された。代謝関連遺伝子の transcriptome については、cKP (F/F) では、グルコーストランスポーターである *Glut1* や解糖系酵素 (*HK1*、*HK2*、*PFKL*、*PFKP*) の発現が cKP (F/+) 膵臓に比べて増加し、乳酸合成に機能する *LDHa* および *LDHb* の発現も増加したことから、乳酸へのフラックスを伴う解糖が亢進していることが示唆された。そこで、解糖系酵素の発現上昇の意義を明らかにするため、メタボローム解析を行った (右図 E)。cKP (F/F) の組織は、cKP (F/+) の組織よりも G6P、F6P、F1,6P のレベルが高く、解糖系の活性化を示した。さらに、cKP (F/F) では cKP (F/+) の膵臓に比べて乳酸の増加 (5.4 倍) が認められ、統計的に有意であった ($p=0.023$)。これらの結果から、cKP (F/F) の膵臓は 80 日までに Warburg 効果の兆候を示すことがわかった。



(4) cKP マウスにおける *Ppp6c* 欠損は、骨格筋の萎縮と脂肪組織の減少を促進する

最近の解析では、ヒト PDAC 細胞由来の IL-6 がマウスの筋肉の萎縮と脂肪分解を誘導することが明らかになった。cKP (F/F) の血中 IL-6 濃度は cKP (F/+) に比べて有意に高いことから、各遺伝子型の筋肉と脂肪を比較した。筋肉組織の横断面図では、cKP (F/F) では筋肉が細く、筋原線維の横断面積が小さいことがわかった。IL-6 シグナルは、筋肉中の E3 リガーゼ (*Atrogin1* と *MuRF1*) とオートファジー関連タンパク質 (*Atg5* と *Bnip3*)²⁸ をコードする遺伝子の転写をアップレギュレートし、悪液質における筋肉の萎縮を引き起こすと報告されている。そこで、トランスクリプトームの解析結果より、筋肉における遺伝子発現を検討した。cKP (F/F) の腓腹筋では、これら 4 つの遺伝子の発現がすべて顕著に上昇していた (右図 A)。次に、3 つの遺伝子型の各雄マウス 4 匹を用いて、脂肪組織への影響を調べた。cKP (F/F) マウスの精巢上体脂肪組織の重量は、cKP (F/+) および cKP (+/+) に比べて著しく減少していた (右図 B)。また、cKP (F/F) の血清中には、脂肪組織の分解に由来する遊離脂肪酸とグリセロールが減少していることが観察され (右図 B)、80 日齢までに脂肪組織が著しく枯渇していることが示唆された。



(5) まとめ

cKP マウスの膵臓で *Ppp6c* を欠損すると、変異誘発後 150 日以内になんによる死亡が促進された。また、*Ppp6c* ホモ欠損 cKP マウスを *Ppp6c* ヘテロまたは野生型 cKP マウスと 80 日齢で比較したところ、*Ppp6c* ホモ欠損マウスでは、腫瘍化の割合、大きさ、悪性度のいずれにおいても亢進していた。以上のことから、*Ppp6c* は新規の膵臓腫瘍がん遺伝子であると結論づけた。調べる限りでは、セリン・スレオニンホスファターゼがマウスの膵臓発癌においてがん抑制遺伝子として機能していることを示したのは、今回のものが初めてである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanazawa K, Kishimoto K, Nomura M, Kurosawa K, Kato H, Inoue Y, Miura K, Fukui K, Yamashita Y, Sato I, Tsuji H, Watanabe T, Tanaka T, Yasuda J, Tanuma N, Shima H	4. 巻 112(6)
2. 論文標題 Ppp6c haploinsufficiency accelerates UV-induced BRAF(V600E)-initiated melanomagenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2233-2244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14895.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kishimoto K, Kanazawa K, Nomura M, Tanaka T, Shigemoto-Kuroda T, Fukui K, Miura K, Kurosawa K, Kawai M, Kato H, Terasaki K, Sakamoto Y, Yamashita Y, Sato I, Tanuma N, Tamai K, Kitabayashi I, Matsuura K, Watanabe T, Yasuda J, Tsuji H, Shima H	4. 巻 10(13)
2. 論文標題 Ppp6c deficiency accelerates K-ras(G12D)-induced tongue carcinogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 4451-4464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3962.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------